

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



JC986 U.S. PRO 11  
09/94 3411  
09/94 3411  
08/30/01

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 44 373.7  
**Anmeldetag:** 08. September 2000  
**Anmelder/Inhaber:** Roche Diagnostics GmbH,  
Mannheim/DE  
**Bezeichnung:** Neues Reagenz zur Markierung von  
Nukleinsäuren  
**IPC:** C 09 B, C 07 H, C 07 D

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 19. Juli 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Agur...

## Neues Reagenz zur Markierung von Nukleinsäuren

Die Erfindung entstammt dem Gebiet der Markierung von synthetisch hergestellten Nukleinsäuren.

5

### Stand der Technik

Bei der Durchführung eines breiten Spektrums verschiedenster molekularbiologischer und molekulardiagnostischer Methoden sind synthetisch hergestellte (Desoxy-)-Oligonukleotide, die mit [REDACTED] detektierbaren Markierung versehen sind, erforderlich.

Die Herstellung synthetischer (Desoxy-)-Oligonukleotide erfolgt in der Regel an einer Festphase mit Hilfe der Phosphoramidit-Chemie. Als Festphase werden üblicherweise Glasbeads mit Poren definierter Größe eingesetzt (im Folgenden mit CPG = controlled pore glass abgekürzt). Das 15 erste Monomer ist über eine abspaltbare Gruppe mit dem Träger verbunden, so daß nach Beendigung der Festphasensynthese das freie Oligonukleotid abgespalten werden kann. Zusätzlich enthält das erste Monomer eine geschützte Hydroxylgruppe, wobei üblicherweise als Schutzgruppe Dimethoxytrityl (DMT) verwendet wird. Die Schutzgruppe kann durch Säurebehandlung entfernt werden. In einem zyklischen Verfahren werden dann nacheinander am 5'-Ende ebenfalls 20 mit einer DMT-Schutzgruppe versehene 3'-Phosphoramidit-Derivate von (Desoxy)-Ribonukleosiden an die jeweils von der DMT-Schutzgruppe befreite reaktive Gruppe gekoppelt.

Für die Herstellung von am 3'-Ende-markierten Oligonukleotiden werden gemäß dem Stand der Technik sogenannte trifunktionelle Trägermaterialien verwendet. Dazu wird zunächst ein trifunktioneller Abstandshalter mit zwei reaktiven Hydroxylgruppen und einer weiteren reaktiven Gruppe, vorzugsweise einer Aminogruppe bereitgestellt. Nach Einführung einer DMT-Schutzgruppe an eine Hydroxylgruppe erfolgt in einem 2. Syntheseschritt die Kopplung der detektierbaren Markierung an die reaktive Aminogruppe des trifunktionellen Abstandshalters. Alternativ kann die detektierbare Markierung jedoch nicht nur über eine reaktive Aminogruppe 30 sondern auch über eine dritte Hydroxylgruppe oder eine SH-Gruppe an den trifunktionellen Abstandshalter gekoppelt werden (US 5,451,463; WO 92/11388).

In einem dritten Schritt wird der trifunktionelle Abstandshalter über seine noch freie Hydroxylgruppe an die mit einer abtrennbaren Bindung versehene Verbindungsgruppe des Festphasenmaterials gebunden.

5 Alternativ kann die Kopplung der detektierbaren Markierung auch erst im Anschluß an die eigentliche Oligonukleotidsynthese erfolgen (US 5,141,837). Da dies jedoch multiple unabhängige Kopplungsreaktionen erfordert, ist ein derartiges Herstellungsverfahren aufwendig, kostenintensiv und nicht automatisierbar.

10 Zur Herstellung von am 5'-Ende markierten Oligonukleotiden werden üblicherweise mit einer Markierung versehene Phosphoramidite verwendet, bei denen die Markierungsgruppe über ei-  
[REDACTED]<sub>3-12</sub> Linker mit dem Phosphoramidit verbunden ist.

Detektierbare Markierungen können somit auch über die Phosphoramiditstrategie eingebracht werden (Synlett 1999, 10, 1667-1678). Dazu können die gleichen trifunktionellen Abstandshalter, wie zur Herstellung von CPG Materialien verwendet werden. Dabei wird anstelle der Bindung einer der Hydroxylgruppen zur Festphase diese Hydroxylgruppe in ein Phosphoramidit überführt. Das resultierende Phosphoramidit kann wie ein Standardamidit in der Oligonucleotidsynthese verwendet werden. Im Prinzip können solche Phosphoramidite auch zur internen 20 Markierung verwendet werden, indem man während des Synthesezyklus ein Standardnucleosidphosphor -amidit durch ein Fluorophor markiertes Phosphoramidit ersetzt. Bevorzugt setzt man es jedoch zur 5' Markierung ein, da bei der internen Markierung die Basenpaarung im Strang unterbrochen wird.

25 Vielfach werden in der Molekularbiologie, zum Beispiel bei der Echtzeitmessung von PCR-Reaktionen (WO 97/46707), Oligonukleotide verwendet, die mit einer Fluoreszenzmarkierung, beispielsweise mit Fluorescein, versehen sind. Dabei kann die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die Aminogruppe des trifunktionellen Abstandshalters nach dem Stand der Technik auf zwei verschiedene Arten erfolgen:

30 Zum einen kann der Fluoreszenzfarbstoff, der gegebenenfalls selbst mit abspaltbaren Schutzgruppen zum Schutz während der Oligonukleotidsynthese versehen sein kann, in Form eines Isothiocyanates mit der Aminogruppe zu einer Thioharnstoffbindung umgesetzt werden. Dies hat jedoch den Nachteil, dass eine derartige Thioharnstoffbindung während der Oligonukleotidsynthese nicht stabil ist und somit keine hohen Syntheseausbeuten von Fluoreszenz-  
35

markierten Oligonukleotiden erzielt werden können (Bioconjugate Chemistry 1998, 9, 627-632). In einem alternativen Verfahren kann der N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) einer Fluorophorcarbonsäure mit der freien Aminogruppe des Abstandshalters zu einer Amidbindung umgesetzt werden. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass aufgrund der Elektronen-Akzeptorwirkung der Amidbindung die spektralen Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes dahingehend verändert werden, dass das Emissionsspektrum eines Amid-gekoppelten Derivates gegenüber dem Emissionsspektrum eines Thioharnstoff-gekoppelten Derivates hin zu höheren Wellenlängen verschoben ist.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Markierungsreagenzien für die Herstellung markierter Oligonukleotide, bei denen die Markierung keiner starken Elektro-  
[REDACTED] Akzeptorwirkung ausgesetzt ist und während der Oligonukleotidsynthese stabil bleibt.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war insbesondere auch die Bereitstellung von Trägermaterialien für die Herstellung Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden, die einerseits während der Oligonukleotidsynthese eine hinreichend stabile Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes gewährleisten und andererseits die spektralen Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes gegenüber den mit einem Thioharnstofflinker gekoppelten Derivaten unbeeinflusst lassen.

20

## Kurzbeschreibung der Erfindung

[REDACTED] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ein Markierungsreagenz der Struktur

$$\begin{array}{c} \text{M} - \text{NH} - \text{CO} - \text{L} - \text{Z} - (\text{CH}_2)_n - \text{O} - \text{S} \\ | \\ (\text{CH}_2)_m - \text{O} - \text{K} \end{array}$$

wobei

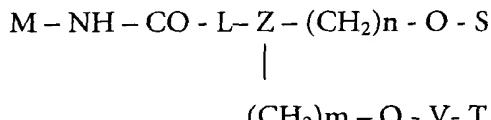
30

- M eine detektierbare Markierung ist
- L einen Linker der Struktur  $-(\text{CH}_2)_p-$  oder der Struktur  $-(\text{CH}_2)_p-\text{CO}-\text{NH}-$  darstellt
- Z entweder CH oder N ist,
- S eine abspaltbare Schutzgruppe ist,
- n, m und p voneinander unabhängige natürliche Zahlen von 1-15 sind,

35

- O - K entweder ein Phosphoramidit ist,  
oder K = - V - T, so dass T ein Festphasen-Trägermaterial ist, und  
V eine Verbindungsgruppe ist, die eine abtrennbare Bindung enthält.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch ein markierter reaktiver Träger der Struktur

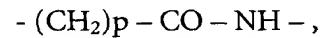


10 wobei

 M eine detektierbare Markierung darstellt

- L einen Linker der Struktur - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - oder der Struktur - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - CO - NH - darstellt
- Z entweder CH oder N ist
- n, m und p voneinander unabhängige natürliche Zahlen von 1-15 sind,
- S eine abspaltbare Schutzgruppe ist, und
- T ein Festphasen-Trägermaterial ist.

20 Der Linker L besitzt vorzugsweise die Struktur



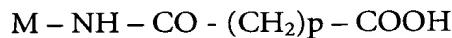
25 wobei p eine natürliche Zahl von 1-15 ist.

Als Festphasenträgermaterial dienen dabei in der Regel poröse Glas- oder Polystyrolpartikel mit einer definierten Porengröße. Bei der abspaltbaren Schutzgruppe S handelt es sich üblicherweise um Dimethoxytrityl (DMT), Pixyl, oder eine photochemisch abspaltbare Nitrobenzylgruppe wie beispielsweise NPEOC (Tetrahedron 53, S. 4247-4264 (1997)).

30 Für eine Vielzahl von potentiellen Anwendungen der Erfindung ist der reaktive Träger mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise Fluorescein als detektierbarer Markierung versehen. Enthält der Fluorophor reaktive Gruppen wie z.B. Hydroxygruppen bei Fluorescein, so müssen diese Hydroxygruppen geschützt werden, um eine unerwünschte Reaktion mit den Phosphoramiditen 35 während der Oligosynthese zu verhindern. Pivaloyl ist beispielsweise eine geeignete Schutzgrup-

pe, da diese nach Beendigung der Oligosynthese unter Standardbedingungen abgespalten werden kann.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist darüber hinaus die Verwendung eines Moleküls der 5 Struktur

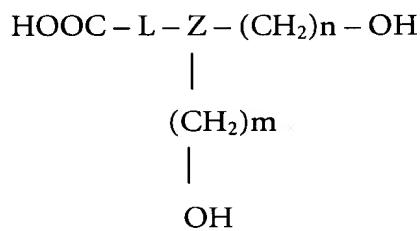


wobei p eine natürliche Zahl zwischen 1 und 15 darstellt und M eine detektierbare Markierung 10 darstellt, zur Herstellung eines erfindungsgemäßen reaktiven Trägers.

Vorzugsweise erfolgt diese Herstellung durch ein Verfahren, enthaltend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung eines trifunktionellen Abstandshalters mit 2 reaktiven Hydroxyl-  
15 Gruppen und einer reaktiven Aminogruppe
- b) Einführung einer Schutzgruppe, beispielsweise DMT an einer Hydroxylgruppe
- c) Umwandlung der Carbonsäuregruppe des oben beschriebenen Moleküls in ei-  
nen aktivierten Ester, vorzugsweise einen N-Hydroxy-Succinimidester
- d) Kopplung des aktivierten Esters an die reaktive Aminogruppe des trifunktio-  
20 nellen Abstandshalters
- e) Kopplung der noch freien Hydroxylgruppe des trifunktionellen Abstandshal-  
ters an das Trägermaterial.

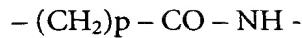
Alternativ kann der erfindungsgemäße reaktive Träger unter Verwendung eines trifunktionellen 25 Abstandshalters der Struktur



hergestellt werden, wobei L einen Linker der Struktur

35  $-(CH_2)_p -$

oder der Struktur



5

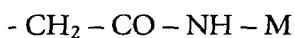
darstellt und p eine natürliche Zahl zwischen 1 und 15 ist.

Ein derartiges Verfahren enthält vorzugsweise folgende Schritte:

10        a)        Bereitstellung des beschriebenen trifunktionellen Abstandshalters  
              b)        Einführung der Schutzgruppe an eine Hydroxylgruppe  
              c)        Aktivierung der Carbonsäuregruppe des trifunktionellen Abstandshalters zu  
                      einem aktivierten Ester  
              d)        Umsetzung des Aktivesters mit der freien Aminogruppe des detektierbaren  
15        Moleküls.  
              e)        Kopplung der noch freien Hydroxylgruppe an das Trägermaterial.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind darüber hinaus die Verwendung des erfindungsgemäßen reaktiven Trägers zur Synthese 3'-markierter Nukleinsäuren, beispielsweise (Desoxy-) 20 Oligonukleotiden sowie 3' markierte Nukleinsäuremoleküle, die mithilfe eines erfindungsgemäßen Trägers hergestellt wurden und infolgedessen an ihrem 3'-Ende eine neue chemische Struktur aufweisen. Dies betrifft insbesondere auch Nukleinsäuremoleküle, die an der 3'-Position der terminalen Ribose einen Substituenten der Substruktur

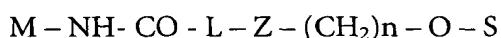
25



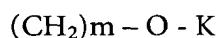
aufweisen, wobei M eine detektierbare Markierung, beispielsweise einen Fluoreszenzfarbstoff ist.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Phosphoramidite der Struktur

30



|



35

wobei

- M eine detektierbare Markierung ist

- L einen Linker der Struktur – (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> – oder der Struktur – (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> – CO – NH – darstellt
- Z entweder CH oder N ist,
- S eine abspaltbare Schutzgruppe ist,
- 5 - n, m und p voneinander unabhängige natürliche Zahlen von 1-15 sind, und
- O - K ein Phosphoramidit ist.

Unter dem Begriff „Phosphoramidit“ sind in diesem Zusammenhang sämtliche, dem Fachmann als Phosphoramidit bekannte Verbindungen zu verstehen (Beaucage, Methods in Molecular 10 Biology, ed. S. Agrawal, Vol 20, S. 33-61, 1993).

Bei der Markierung handelt es sich vorzugsweise um einen gegebenenfalls mit Schutzgruppen versehenen Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise Fluorescein.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Phosphoramidite zur Synthese markierter Nukleinsäuren. Nukleinsäuren, die mit Hilfe dieser Phosphoramidite markiert werden, sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Derartige Moleküle enthalten einen Substituenten mit dem Strukturelement – CH<sub>2</sub> – CO – NH – M, wobei M die detektierbare Markierung wie beispielsweise den Fluoreszenzfarbstoff bezeichnet. In einer bevorzugten 20 Ausführungsform ist der Substituent kovalent mit der 5' Position der 5' terminalen Ribose der markierten Nukleinsäure verbunden.

### **Amalierte Beschreibung der Erfindung**

25 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind einige der verwendeten Begriffe wie folgt zu definieren:

Als reaktive Gruppe werden Gruppen eines Moleküls bezeichnet, die in der Lage sind, bei geeigneten Bedingungen unter Entstehung einer kovalenten Bindung mit einem weiteren Molekül zu 30 reagieren. Beispiele für reaktive Gruppen sind Hydroxyl-Gruppen, Amino-Gruppen und Carbonsäure-Gruppen.

Als Schutzgruppe werden Moleküle bezeichnet, die mit einer oder mehreren reaktiven Gruppen eines Moleküls reagieren, sodass im Rahmen einer mehrstufigen Synthese-Reaktion nur eine be- 35 stimmte, nicht geschützte reaktive Gruppe mit dem gewünschten Reaktionspartner reagieren

kann. Beispiele für häufig verwendete Schutzgruppen sind Dimethoxytrityl (DMT), welches vorzugsweise zum Schutz von Hydroxylgruppen eingesetzt wird sowie Fmoc, welches vorzugsweise zum Schutz von Aminogruppen eingesetzt wird.

5 Trifunktionelle Abstandshalter sind Moleküle mit einem zentralen Kohlenstoff- oder Stickstoffatom mit drei im wesentlichen aus Kohlenstoff bestehenden Seitenketten, an deren Ende sich jeweils eine reaktive Gruppe befindet.

Als Festphasen-Trägermaterial werden polymere Substanzen bezeichnet, die eine Festphase mit einer reaktiven Gruppe bilden, an denen weitere Moleküle immobilisiert werden können. In der Regel handelt es sich bei der Oligonukleotidsynthese um poröse Glasbeads mit einer definierten Porengröße (CPG). Alternativ dazu können auch Polystyrolharze und andere organische Polymere und Copolymere verwendet werden. ( J. Indian. Chem. Soc. 1998, 75, 206-218) Für den Fall, dass die Oligonukleotide nach der Synthese am Substrat immobilisiert bleiben sollen, können 10 als Festphasen-Trägermaterial Glas oder auch Halbleiterchips verwendet werden.

Unter einem markierten reaktiven Träger ist ein Festphasen-Trägermaterial zu verstehen, an dem eine weitere Verbindung mit einer detektierbaren Markierung sowie einer noch geschützten reaktiven Gruppe immobilisiert ist.

20 Als Linker werden Kohlenstoffketten mit einer Länge von 1-15 C-Atomen bezeichnet. Derartige Linker können außerdem auch noch einzelne oder mehrere Stickstoffatome aufweisen. 25 Aus diesen Linkern aus können Linker auch einzelne oder mehrere Ethylenglykol-Einheiten enthalten.

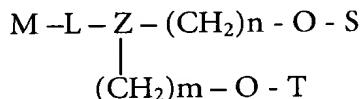
25 Unter einer detektierbaren Markierung sind Substanzen zu verstehen, die mit Hilfe von analytischen Methoden nachgewiesen werden können. Dabei kann es sich beispielsweise um massenspektroskopisch, immunologisch oder mit Hilfe von NMR nachweisbare Substanzen handeln. Insbesondere sind unter detektierbaren Markierungen auch Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise 30 Fluoresceine oder Rhodamine zu verstehen.

30 Als Phosphoramidite werden Moleküle mit einem dreiwertigen Phosphor-Atom bezeichnet, die an das 5'-terminale Ende eines Nukleosids bzw. Nukleosidderivates gekoppelt werden können. Somit sind Phosphoramidite bei der Oligonukleotidsynthese einsetzbar. Neben den für eine Kettenverlängerung verwendeten (Desoxy)-Ribonukleotid-Phosphoramiditen existieren mit einer 35 Markierung derivatisierte Phosphoramidite, die in analogen Verfahren während bzw. am Ende

der Oligonukleotidsynthese zur Markierung des Oligonukleotids verwendet werden können (Beaucage, Methods in Molecular Biology, ed. S. Agrawal, Vol 20, S. 33-61, (1993)), (Synlett 10, 1667-1678(1999)).

5 Der Begriff „Oligonukleotide“ subsummiert im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung nicht nur (Desoxy)-Oligo-Ribonukleotide, sondern auch sämtliche DNA- bzw. RNA-Derivate wie beispielsweise Methylphosphonate, Phosphothioate oder 2'-O-Alkylderivate sowie DNA-Analoga wie LNA, HNA (18, S. 1365-1370 (1999)) und Nukleinsäuren bzw. deren Analoga, die auch modifizierte Basen wie zum Beispiel 7-Deazapurine enthalten sowie auch Chimäre aus unterschiedlichen Typen von Nukleinsäuren und deren Analoga.

Ein markierter reaktiver Träger der Struktur



15 hat sich in der Vergangenheit als besonders geeignet für Oligonukleotidsynthesen erwiesen. Dabei bezeichnet L einen Linker. Gemäß dem Stand der Technik enthält dieser Linker eine Amidbindung, bei der das Kohlenstoffatom direkt mit der Markierung verbunden ist.

20 T bezeichnet ein Festphasen-Trägermaterial, vorzugsweise CPG, welches kommerziell erhältlich ist (z. B. Proligo, CPG Inc.). Solche kommerziellen Trägermaterialien sind an der Oberfläche mit Aminogruppen modifiziert.

25 Der Träger T kann über eine sogenannte Verbindungsgruppe V enthaltend eine abspaltbare Bindung mit dem Rest des Moleküls verbunden sein. Als Verbindungsgruppe mit abspaltbarer Bindung werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung solche Gruppen bezeichnet, die sich zwischen dem trifunktionellen Abstandshalter und dem Festphasen-Trägermaterial befinden und durch eine einfache chemische Reaktion gespalten werden können. Dabei kann es sich um Succinyl- oder Oxalyl- oder andere Verbindungsgruppen handeln, die eine spaltbare Esterbindung enthalten. Weitere Verbindungsgruppen sind dem Fachmann bekannt (J. Indian. Chem. Soc. 1998, 75, 206-218).

30 35 Derartige Verbindungsgruppen sind essentiell für die Verwendung des Trägermaterials zur Synthese von Oligonukleotiden, die nach Beendigung der Synthese in wässriger Lösung vorliegen

sollen. Für den Fall, daß wie bei der Herstellung von Nukleinsäure-Arrays (US 5,624,711, Nucl. Acids. Res. Vol. 25, S. 1155-1161 (1997)) das Oligonukleotid nach der Synthese an der Oberfläche des Trägermaterials verbleiben soll, ist dagegen keine spaltbare Verbindungsgruppe erforderlich, sondern es wird vielmehr eine nicht spaltbare Verbindungsgruppe bevorzugt.

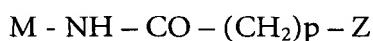
5

Über eine Kohlenstoffkette mit 1-15 C-Atomen ist das Trägermaterial mit einem trifunktionellen zentralen Atom Z verbunden, bei dem es sich vorzugsweise ebenfalls um Kohlenstoff oder aber alternativ um Stickstoff handelt. An diesem zentralen C-Atom befindet sich eine weitere Kohlenstoffkette mit 1-15 C-Atomen, an deren Ende eine abspaltbare Schutzgruppe S, vorzugsweise DMT, vorhanden ist. Vor Beginn der Oligonukleotidsynthese kann diese Schutzgruppe durch schwache Säurebehandlung abgespalten werden. Danach kann eine Kopplung von 3'-Phosphoramidit-Derivaten von (Desoxy-)-Ribonukleosiden an die freigewordene reaktive Gruppe erfolgen.

10 15 Die detektierbare Markierung M ist vorzugsweise ein Fluoreszenzfarbstoff. Enthalten derartige Markierungen reaktive Gruppen, die mit der Oligonukleotidsynthese interferieren können, so ist der Fluoreszenzfarbstoff mit dem Fachmann bekannten Schutzgruppen versehen, um unspezifische Reaktionen im Laufe einer Oligonukleotidsynthese ausschließen zu können. Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise Fluorescein können wirkungsvoll mit Pivaloyl geschützt werden.

20

In der Regel ist die detektierbare Markierung über einen speziellen Linker mit dem zentralen Atom verbunden. Als erfindungsgemäßes Charakteristikum besitzt dieser Linker die Struktur



oder

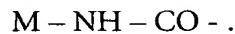


wobei p eine natürliche Zahl zwischen 1 und 15 ist.

30

Mit anderen Worten bedeutet dies, daß die Orientierung der Amidbindung zwischen Markierung M und Linker L bzw. Zentralatom Z gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Verbindungen invertiert ist.

Charakteristisch für die erfindungsgemäße Struktur des Linkers ist somit die Existenz der Teilstruktur



5

Dadurch ist gewährleistet, dass die Elektronen-Akzeptorwirkung der dargestellten Amid-Bindung im Vergleich zu der aus dem Stand der Technik bekannten Struktur



10

wesentlich geringer ist. Dies hat den Vorteil, dass beispielsweise bei einer Fluoreszenzfarbstoff-Markierung die spektralen Eigenschaften des erfindungsgemäß konjugierten Fluoreszenzfarbstoffs aufgrund der Orientierung der Amidbindung nahezu identisch mit den spektralen Eigenschaften eines nach der Thioharnstoff-Methode konjugierten Farbstoffs sind. Im Vergleich zur 15 Thioharnstoffkopplung entsteht durch die erfindungsgemäße Linkerstruktur jedoch eine wesentlich stabilere Verbindung, die auch während der Oligonukleotidsynthese stabil bleibt.

Der erfindungsgemäß markierte reaktive Träger lässt sich prinzipiell durch zwei verschiedene Verfahren herstellen. In einer ersten Ausführungsform wird ein reaktiver trifunktioneller Abstandshalter enthaltend zwei reaktive Hydroxylgruppen und eine reaktive Aminogruppe mit einer NHS-aktivierten Carbonsäuregruppe einer detektierbaren Markierung umgesetzt. In einem alternativen Verfahren wird ein trifunktioneller Abstandshalter mit einer reaktiven Carbonsäuregruppe zunächst in einen aktivierten Ester umgewandelt und sodann mit einer reaktiven Aminogruppe eines detektierbaren Moleküls umgesetzt.

25

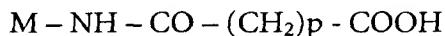
Beide Verfahren sind Bestandteil der vorliegenden Erfindung und werden somit im folgenden näher erläutert. Zur Durchführung der einzelnen Syntheseschritte werden allgemeine, dem Fachmann bekannte organisch-präparative Methoden verwendet. Die angegebenen Verfahren stellen dabei lediglich exemplarische Alternativen dar und begrenzen nicht den Rahmen der vorliegenden Erfindung.

a) Herstellung eines erfindungsgemäßen Trägers ausgehend von einem trifunktionellen Abstandshalter mit einer reaktiven Aminogruppe

Als kommerziell erhältlicher Abstandshalter mit einem zentralen Kohlenstoffatom und einem freien Stickstoffatom kann beispielsweise Serinol verwendet werden. Ausgehend von den kommerziell erhältlichen Verbindungen 2-Hydroxethylhydrazin und Oxiran kann ein trifunktioneller Abstandshalter mit einem zentralen Stickstoffatom erhalten werden.

5 An den trifunktionellen Abstandshalter wird in einem ersten Verfahrensschritt an einer der reaktiven Hydroxylgruppen eine Schutzgruppe eingeführt, so dass diese Seitenkette während der folgenden Syntheseschritte nicht mit anderen Reaktionspartnern reagieren kann. Als Schutzgruppe wird üblicherweise Dimethoxytrityl (DMT) nach bekannten Verfahren eingeführt (J. Am. Chem. 10 Soc. 1963, 85, 3821). Nach dem Ende der Reaktion werden diejenigen Moleküle, welche mit nur einer Schutzgruppe versehen sind, durch dem Fachmann bekannte säulenchromatographische Verfahren isoliert.

15 Durch dem Fachmann ebenfalls bekannte organische Syntheseverfahren können detektierbare Markierungssubstanzen M, die eine freie terminale Aminogruppe aufweisen, durch Reaktion mit einer entsprechenden aktivierten Dicarbonsäure wie zum Beispiel einem Dicarbonsäureanhydrid und unter Herstellung einer Amidbindung in ein Molekül der Struktur

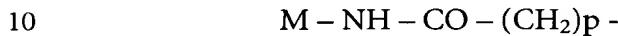


20 umgewandelt werden, wobei die Länge p der  $CH_2$ -Kette mindestens 1 und höchstens 15 beträgt. Derartige Verbindungen mit einem Carbonsäurerest können durch Reaktion mit N-Hydroxy-Succinimid unter dem Fachmann bekannten Bedingungen in einen N-Hydroxy-Succinimid-Ester umgewandelt werden. Insbesondere Fluoreszenzfarbstoffmoleküle können auf diese Weise 25 in ein entsprechendes NHS-Ester-Derivat umgewandelt werden. Enthält die Markierungsgruppe M freie reaktive Gruppen, wie z. B. Hydroxygruppen so müssen diese jedoch vorher mit entsprechenden, dem Fachmann bekannten Schutzgruppen werden.

30 In einem weiteren Reaktionsschritt wird der markierte NHS-Ester an die freie Aminogruppe des trifunktionellen Abstandshalters nach üblichen Verfahren gekoppelt. Anschließend wird die noch freie Hydroxylgruppe des trifunktionellen Abstandshalters nach üblichen Verfahren an das Trägermaterial, bei dem es sich in der Regel um CPG handelt, immobilisiert. Zu diesem Zweck wird 35 derivatisiertes Trägermaterial, welches eine reaktive Gruppe, wie beispielsweise eine Hydroxyl-, Amino-, Thiol- oder Carboxyl-Gruppe aufweist, eingesetzt.

Nach der Immobilisierung müssen durch eine dem Fachmann bekannte sogenannte „Capping“-Reaktion noch freie reaktive Gruppen des Trägermaterials desaktiviert werden (Pon R.T., in Methods in Molecular Biology, Vol 20., Ed. S. Agrawal Humana Press Inc. New Jersey , Chap. 19 p. 481 – 482 (1993)). So werden beispielsweise noch freie Aminogruppen durch eine Acylierungsreaktion desaktiviert.

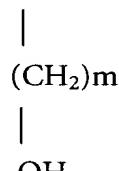
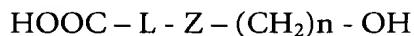
Durch das erfindungsgemäße Verfahren entsteht somit eine immobilisierte Verbindung mit dem Strukturelement



die aufgrund der erwähnten vorteilhaften Eigenschaften insbesondere zur Synthese 3'terminal markierter Nukleinsäuren verwendet werden kann.

15 b) Herstellung eines erfindungsgemäßen Trägers ausgehend von einem trifunktionellen Abstandshalter mit einer reaktiven Carbonsäuregruppe

Ausgehend von einem konventionellen trifunktionellen Abstandshalter mit zwei freien Hydroxylgruppen und einer freien Aminogruppe wird zunächst durch Reaktion mit einer Dicarbonsäure nach üblichen Verfahren unter Erzeugung einer Amidbindung eine Verbindung der 20 allgemeinen Struktur

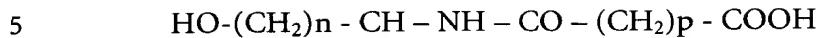
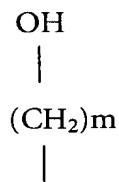


hergestellt, wobei Z entweder CH oder N ist, und

30 L einen Linker der Struktur  $-(CH_2)_p -$  oder der Struktur  $-(CH_2)_p - CO - NH -$  darstellt, und gleichzeitig m, n und p unabhängig voneinander jeweils eine natürliche Zahl zwischen 1 und 15 sind.

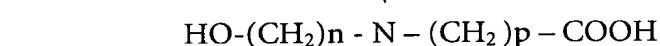
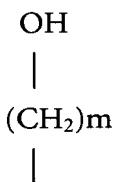
Bevorzugt ist eine Verbindung der Struktur:

35



m, n und p sind dabei unabhängig voneinander natürliche Zahlen zwischen 1 und 15.

Ebenfalls bevorzugt kann von einem Abstandhalter mit zentralem Stickstoffatom ausgegangen  
10 werden:



m, n und p sind dabei ebenfalls unabhängig voneinander natürliche Zahlen zwischen 2 und 15.  
Besonders vorteilhaft sind Moleküle wie das kommerziell erhältliche Bicin, bei dem n und m = 2  
20 sind. Der Grund dafür liegt darin, daß es für die Stabilität von derartigen Verbindungen in jedem  
Falle von Vorteil ist, wenn sich zwischen dem zentralen N-Atom und den beiden terminalen Hy-  
droxylgruppen zumindest 2 C-Atome befinden.

25 Dann wird an eine der reaktiven Hydroxylgruppen eine Schutzgruppe wie beispielsweise DMT  
eingeführt, so dass diese Schutzgruppe während der folgenden Syntheseschritte nicht mit ande-  
ren Reaktionspartnern reagieren kann. Nach dem Ende der Reaktion werden diejenigen Mole-  
küle, welche mit nur einer Schutzgruppe versehen sind, durch dem Fachmann bekannte präpa-  
rative säulenchromatographische Verfahren isoliert.

30 Daran anschließend wird die noch freie Carbonsäuregruppe unter dem Fachmann bekannten  
Bedingungen aktiviert. Insbesondere hat sich auch eine Aktivierung mit Triphosgen und DMF als  
besonders geeignet herausgestellt.

35 In einem weiteren Schritt kann dann die Kopplung eines eine reaktive Aminogruppe enthalten-  
den detektierbaren Moleküls wie beispielsweise einem Fluoreszenzfarbstoffmolekül an den tri-

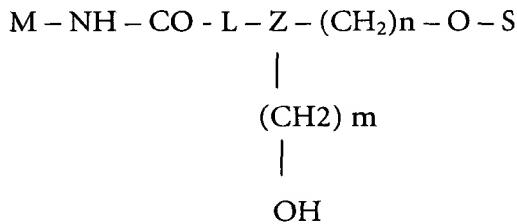
funktionellen Abstandshalter erfolgen. Auf diese Weise entsteht ein trifunktioneller Abstandhalter, bei dem wie unter a) beschrieben eine Hydroxygruppe mit Dimethoxytrityl geschützt ist, das Zentralatom über einen Linker mit der Markierungsgruppe verbunden ist und eine freie Hydroxygruppe enthält.

5

Abschließend wird analog zu dem unter a) beschriebenen Verfahren die noch freie Hydroxylgruppe des trifunktionellen Abstandshalters nach üblichen Verfahren an das Trägermaterial, bei dem es sich in der Regel um CPG handelt, immobilisiert. Wiederum müssen nach der Immobilisierung durch eine dem Fachmann bekannte sogenannte „Capping“-Reaktion die noch freien 10 reaktive Gruppen des Trägermaterials desaktiviert werden.

In einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann es sich bei dem Markierungsreagenz um ein Nicht-Nukleosidisches Phosphoramidit handeln.

15 Analog zu den erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung reaktiver Träger erfolgt zunächst in einem ersten Schritt die Herstellung eines Zwischenproduktes der allgemeinen Formel:



wobei M eine detektierbare Markierung und Z entweder CH oder N ist. S bezeichnet eine abspaltbare Schutzgruppe, L einen Linker der Struktur  $-(CH_2)_p-$  oder der Struktur  $-(CH_2)_p - CO - NH -$  und n, m und p sind voneinander unabhängige natürliche Zahlen von 1-25 15.

Vorzugsweise handelt es sich für diese Ausführungsform bei der Schutzgruppe S um Dimethoxytrityl. Gleichermassen ist es vorteilhaft, wenn eventuelle reaktive Gruppen der Markierung ebenfalls mit Schutzgruppen versehen sind.

Diese Vorstufen können in einem 2. Schritt dann nach bekannten Methoden durch Umsetzung der noch freien Hydroxylgruppe in ein erfindungsgemässes Phosphoramidit überführt werden (z.

B. Meyer R.B. in Methods in Mol Biol Vol 26 Ed S. Agrawal, Humana Press Inc. 1994, Chapter 2 p 80).

Derartige erfindungsgemäße Phosphoramidite können zur Markierung von Nukleinsäuren und 5 insbesondere zur Markierung von Oligonukleotiden verwendet werden. Dabei kann die Markierung am 5'-Ende, am 3'-Ende oder aber auch intern als sogenannte „abasic site“ in Oligonukleotide eingeführt werden.

Bei einer 5'-Markierung an der 5'-Position der Ribose des 5'-terminalen Nukleotids erfolgt der 10 Einbau nach konventionellen Methoden am Ende der Oligonukleotid-Synthese (Beaucage, Methods in Molecular Biology, ed. S. Agrawal, Vol 20, S. 33-61, (1993)). Anschließend wird die noch vorhandene Schutzgruppe – in der Regel DMT – entfernt. Auf diese Weise werden Oligonukleotide erhalten, die an der 5' Position der 5' terminalen Ribose einen Substituenten mit dem Strukturelement –  $\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{M}$  aufweisen.

15 Nach erneuter Entfernung der durch das Phosphoramidit eingebrachten Schutzgruppe kann wiederum im Rahmen einer klassischen Oligonukleotid-Synthese an der freien Hydroxylgruppe eine Kettenverlängerung in Richtung 3'-5' erfolgen. Auf diese Weise entsteht ein intern markiertes Nukleinsäuremolekül, mit einer sogenannten internen „abasic Site“.

20 Eine Markierung am 3'-Ende erfolgt nach folgendem Prinzip: Als Träger wird kommerziell erhältliches 3' Phosphat-CPG (zB Glenn Research ) verwendet. Im ersten Syntheszyklus wird ein erfindungsgemäßes Phosphoramidit eingesetzt. Da dieses eine weitere tritylierte Hydroxylfunktion enthält, kann nach der Abspaltung der DMT Schutzgruppe an der nun freien Hydroxylgruppe 25 die Standard-Oligonukleotidsynthese begonnen werden. Nach Abspaltung vom Träger erhält man dann Oligonukleotide, die an der 3' Position der 3' terminalen Ribose einen Substituenten mit dem Strukturelement –  $\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{M}$  aufweisen.

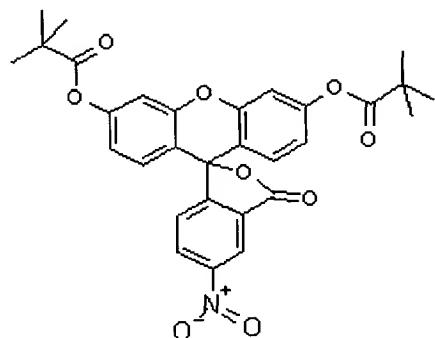
Die folgenden Beispiele charakterisieren die Erfindung weiter:

**Beispiel 1**

**Herstellung eines Dipivaloylfluorescein-NHS-Esters**

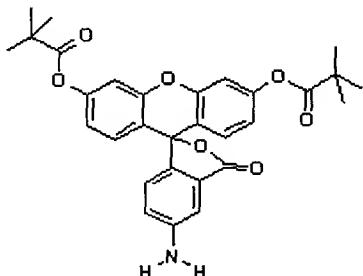
5

A) Dipivaloylnitrofluorescein



Zu einer Suspension von 5 g (13 mmol) 4 – Nitrofluorescein (TCI 199) in einer Mischung aus 100 ml Dichlormethan, 8 ml Pyridin und 6 ml Dimethylformamid wurden unter Eiskühlung 8 ml (65 mmol) Pivalinsäurechlorid (Merck 801276) zugetropft. Die entstehende klare, gelbe Lösung wurde anschließend 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei bildet sich ein weißer Niederschlag (Pyridiniumhydrochlorid), der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde mit 20 ml Dichlormethan und 50 ml Wasser versetzt und in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde getrennt und einmal mit 50 ml Wasser gewaschen. Die abgetrennte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde aus 100 ml Diisopropylether umkristallisiert (Ausbeute: 6.5 g).

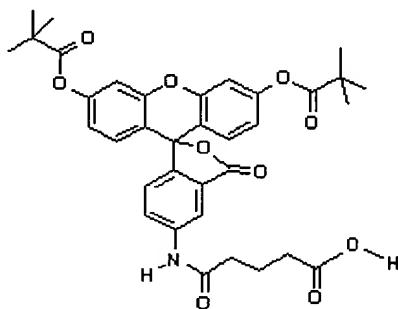
B) Dipivaloylaminofluorescein



20

6,5 g (11,9 mmol) Dipivaloylnitrofluorescein wurden in 100 ml Dioxan gelöst. Dann wurden 650 mg Palladium/Aktivkohle (Merck 807104) gelöst in 20 ml Ethanol hinzugegeben und unter Schütteln 2,5 h Wasserstoff eingeleitet. Danach wurde der Ansatz über Doppelfilter (Rundfilter + Seitzfilterschichten) filtriert und anschließend im Rotationsverdampfer unter Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Der erhaltene Rückstand wurde über eine Kieselgel 60 Säule (Durchmesser = 8,5 cm, Höhe = 30 cm) getrennt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Ethylacetat /Hexan von 2/1 (v/v) verwendet (Ausbeute: 3,0 g).

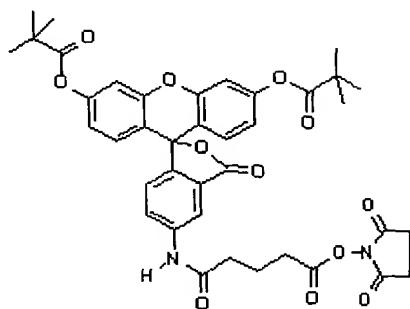
C) Dipivaloyl-4-aminoglutarylfluorescein



Eine Mischung aus 2,6 g (5 mmol) Dipivaloylaminofluorescein, 2,3 g (20 mmol) Glutarsäure-anhydrid, 123mg (1 mmol) Dimethylaminopyridin (Fluka 39405) und 1,4 ml (10 mmol) Triethylamin in 75 ml Chloroform wurde 4 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 50 ml Wasser zugegeben und 15 min weiter gerührt. Die organische Phase wurde im Scheidetrichter abgetrennt und 2 mal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde im Vakuum an Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt.

Der Rückstand wurde über eine Kieselgel 60 Säule (Durchmesser = 8,5 cm, Höhe = 30 cm) aufgetrennt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Toluol /Essigsäureethylester /Methanol im Verhältnis von 4/1/2 (v/v/v) verwendet (Ausbeute: 3,0 g).

D) Dipivaloyl-4-aminoglutarylfluorescein NHS ester

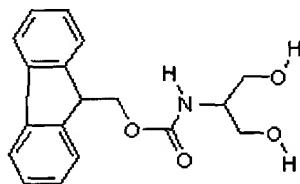


Unter Argon wurden zu einer Lösung von 2,6 g (4,1 mmol) Dipivaloyl-4-aminoglutarylfluorescein in 250 ml trockenem Dichlormethan (4,1 mmol) 1,4 g (12,2 mmol) 5 N-Hydroxysuccinimid gegeben. Anschließend wurde mit 1,93 ml (14,0 mmol) Morpholinoethylisocyanid (14,0 mmol) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde mit einer Mischung aus 600 ml Essigsäureethylester und 100 ml Diethylether versetzt. Die organische Lösung wurde im Scheidetrichter je 3 mal mit je 150 ml 0,2 N HCl und dann einmal mit 150 ml 10 sättigter Kochsalz-Lösung gewaschen. Die abgetrennte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtrieren wurde das Lösungsmittel unter Vakuum am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde 0,5 h im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute 2,7 g).

15 Beispiel 2:

Herstellung einer DMT-Fmoc-Verbindung als trifunktioneller Abstandshalter

A) N-Fmoc 1,3-dihydroxy 2 amino propan



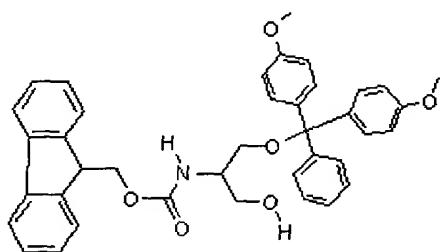
20

21,6 g Fmoc – NHS (Novabiochem. 01-63-001) (64 mmol) wurde in 300 ml Dioxan gelöst und nacheinander mit Serinol (Aldrich 35,7898,) (60 mmol), 200 ml Wasser (VE) und 6,8g Natrim-

hydrogencarbonat (80 mmol) versetzt. Der Ansatz wurde dann und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert.

Das Filtrat wurde mit 1,2 l Wasser und 50 ml gesättigter NaCl-Lösung versetzt, sodaß das Produkt ausgefällt wurde. Nach dem Absaugen des Überstands über eine Glasfritte wurde das Produkt über Nacht im Exsikkator über Calciumchlorid getrocknet. Anschließend wurde eine über eine Kieselgel 60 – Säule (Durchmesser: = 8,5 cm, Höhe = 30 cm) getrennt. Als Laufmittel diente ein Essigsäureethylester/Methanol-Gemisch im Volumenverhältnis 5/1 (Ausbeute: 12,35 g).

10 B) N-Fmoc 1-dimethoxytrityloxy 3-hydroxy 2- amino propan

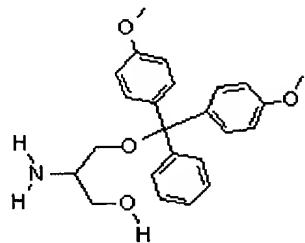


Zu einer Lösung von 12,19 g (38,9 mmol) N-Fmoc 1,3-dihydroxy 2 amino propan in 60 ml trockenem Pyridin wurde unter Argon eine Lösung von 13,85 g (41 mmol) Dimethoxytritylchlorid in 55 ml trockenem Pyridin gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend 15 wurde das Lösungsmittel unter Vakuum am Rotationsverdampfer Ansatz im Rotavapor einrotiert, der Rückstand in 500 ml Essigsäureethylester gelöst und je einmal mit 250 ml Wasser / 250 ml gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtrieren wurde das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer abdestilliert.

20

Anschließend wurde an Kieselgel getrennt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Toluol / Essigsäureethylester / Methanol im Verhältnis 4 / 1 / 0,5 (V/V/V) und einem Zusatz von 0,1% (v) Triethylamin (Ausbeute: 15 g).

C) 1-Dimethoxytrityloxy 3- Hydroxy- 2- amino propan

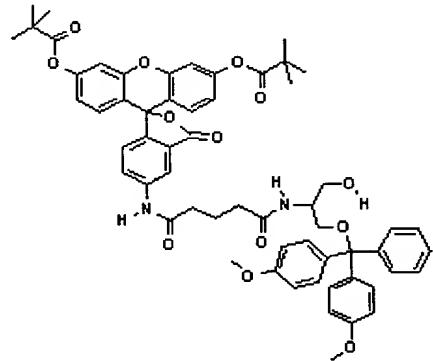


14 g (22,7 mmol) N-Fmoc 1-dimethoxytrityloxy 3-hydroxy 2- amino propan wurden in 200 ml Essigsäureethylester gelöst und anschließend unter Rühren mit 200 ml Piperidin versetzt. Nach 5 Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde im Vakuum am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde an Kieselgel getrennt. Laufmittel: Toluol / Essigsäureethylester/ Methanol im Volumenverhältnis 4 / 1 / 0,5 dem 0,1 % (v) Triethylamin zugesetzt waren (Ausbeute: 6.0 g).

10

**Beispiel 3:**  
**Herstellung eines erfindungsgemäßen Fluorescein-CPG**

A) Reaktion von Glutarylarnino-bispivaloylfluorescein NHS ester mit 1-Dimethoxytrityloxy 3- Hydroxy- 2- amino propan



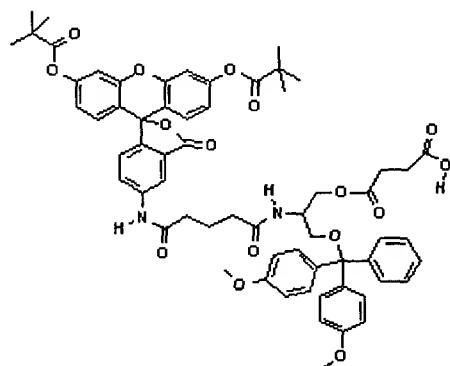
(Herstellung eines erfindungsgemäßen trifunktionellen Abstandshalters substituiert Fluorescein und DMT)

20 2,7 g (3,7 mmol) Glutarylarnino-bispivaloylfluorescein NHS ester und 2,0 g (5,09 mmol) 1-Dimethoxytrityloxy 3- Hydroxy- 2- amino propan wurden in 2,5 ml Pyridin über Nacht unter

Feuchtigkeitsausschluss gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel 60 getrennt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Essigsäureethylester / Methanol, im Verhältnis 8/1 (V/V), dem 0,1 % (v) Triethylamin zugesetzt waren. Ausbeute: 2,4 g (DC: Kieselgel 60 Merck 105735 Toluol/Essig-  
5 säureethylester/Methanol, 4/1/1 Rf = 0.45)

B) Succinylierung

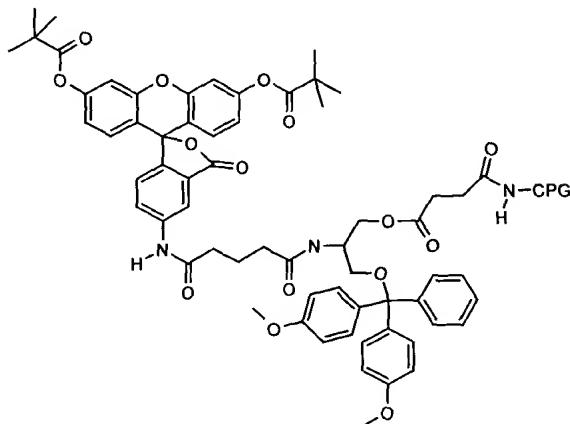
(Herstellung eines trifunktionellen Abstandshalters, substituiert mit Fluorescein, DMT und einer reaktiven Carboxylgruppe)



10

Unter Argon wurde eine Mischung aus 2,33 g (2,3 mmol) Produkt aus A und 0,49g (5 mmol) Bernsteinsäureanhydrid und 61,5 mg (0,5 mmol) DMAP und 30,5 ml trockenem Pyridin über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel 60 getrennt. Als Laufmittel  
15 diente ein Gemisch aus Toluol / Essigsäureethylester / Methanol im Verhältnis 4/1/1 (v/v/v), dem 0,1 % (v) Triethylamin zugesetzt waren (Ausbeute: 2,2 g). (DC: Kieselgel 60 Merck 105735 Toluol/Essigsäureethylester/Methanol, 4/1/1 Rf = 0.42)

C) Herstellung von Fluorescein-CPG der Struktur: (Herstellung eines erfindungsgemäßen Fluorescein-CPG)



Unter Argon wurde in einem 500 ml Rundkolben eine Suspension von 2,2 g (2,0 mmol) Succinat aus Schritt B), 2,0 g (10,4 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und 200mg (1,64 mmol) DMAP in einer Mischung aus 80 ml trockenem DMF und 44 ml trockenem Pyridin solange gerührt, bis alles EDC gelöst war. Dann wurden 28 g lcaa – CPG 500 A (CPG-Inc) hinzugefügt. Danach wurde die Suspension für 16 h bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluss moderat geschüttelt.

10

Anschließend wurde über eine D3 – Glasfritte vakuumfiltriert, der Rückstand nacheinander mit 220 ml DMF, 220 ml THF und 150 ml Ether gewaschen und anschließend trocken gesaugt.

Zum Capping wurde das CPG in einen 500 ml Kolben mit 80 ml Pyridin und 22 ml Acetanhydrid versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur moderat geschüttelt.

Anschließend wurde über eine D3 – Glasfritte vakuumfiltriert und der Rückstand nacheinander 440 ml THF und 125 ml Ether gewaschen. Das CPG Material wurde anschließend 4 h im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 28,4 g).

20

D) Überprüfung der Beladung über Tritylabspaltung:

4,37 mg des CPG Materials wurden in 25 ml DMT-Removal-Reagenz (Roth 2257.2) suspendiert und die Extinktion E bei 498 nm gemessen (E = 0,51)

Epsilon  $_{498\text{ nm}}$  DMT = 14300 ( L \* / mol \* cm)

5

Die Berechnung wurde wie folgt durchgeführt:

$$14,3 \text{ (L * mmol}^{-1} \text{ * cm}^{-1}) * 25 \text{ ml} * E_{498\text{ nm}} / \text{Einwaage (mg)} = \mu\text{mol} / \text{g CPG}$$

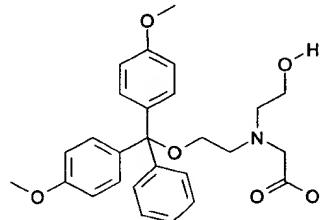
10  $14,3 * 25 \text{ ml} * 0,514 / 4,37 \text{ mg} = 42,05 \mu\text{mol} / \text{g CPG}$

Beispiel 4:

Herstellung eines erfindungsgemäßen Fluorescein-CPG

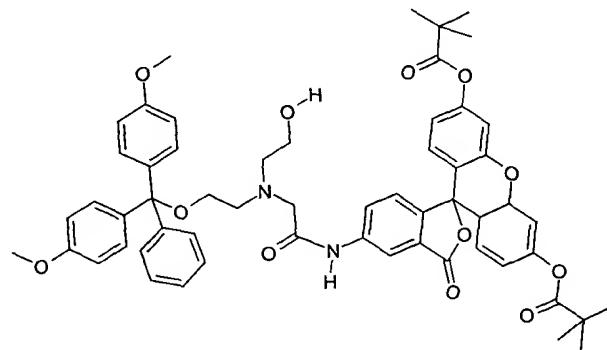
15

A) DimethoxytritylBicin



Zu einer Mischung aus 200 ml Pyridin und 6,56 g (40 mmol) getr. Bicin wurde eine Lösung von 3,38 g (10 mmol) Dimethoxytritylchlorid in 50 ml Pyridin gelöst unter heftigem Rühren zuge-tropft. Bei RT und unter Feuchtigkeitsausschluss wurde dann 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum am Rotationsverdampfer abdestilliert. Danach wurden 200 ml Ethylacetat zugegeben und 10 min geschüttelt. Die Suspension wurde anschließend vaku-umfiltriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml Ethylacetat 10 min gerührt und wiederum vaku-umfiltriert. Der vereinigte Filtrate wurden unter Vakuum am Rotationsverdampfer auf 30 ml eingeengt. Die Lösung wurde nun unter Rühren in 700 ml Hexan getropft. Das Produkt flockt hierbei aus. Danach wurde abgesaugt, mit 200 ml Hexan nachgewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 1,1 g).

B) N-(2Hydroxyethyl)-N (2- dimethoxytrityloxyethyl) 5-(2 amino-ethyl carboxamido) Bispivaloylfluorescein



[REDACTED] unter Argon und unter Rühren wurden 0,52 g (1,75 mmol) Bistrichlormethylcarbonat (Triphosgen) in 30 ml trockenem THF gelöst. Unter Eiskühlung wurde anschließend mit 0.370 ml DMF versetzt und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurden 2.20 ml Triethylamin und dann eine Mischung aus 2,33 g (5mmol) DimethoxytritylBicin und 2,60 g (5 mmol) Di-Pivaloyl-(4'-Amino)-fluorescein gelöst in 20 ml THF zugegeben und dann wurde 16 Stunden bei RT gerührt.

10

Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel 60 getrennt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Toluol / Essigsäureethylester / Methanol im Verhältnis 4/1/1 (v/v/v), dem 0,1 % (v) Triethylamin zugesetzt waren (Ausbeute: 0,6 g ).

15

[REDACTED] Die Succinylierung und Kopplung an den CPG Träger erfolgte wie unter Beispiel 3 beschrieben.

**Beispiel 5:**

20 **Synthese und Reinigung eines 3' markierten Fluorescein 27-mer-Oligonucleotids**

Die Synthese wurde mit Hilfe eines automatischen DNA Synthesizers durchgeführt. (Applied Biosystems, model ABI 392-08) Synthesemaßstab war 1 µmol: Hierzu wurden 24 mg des Fluorescein CPG Materials aus Beispiel 3 in eine empty synthesis column (Glenn Research) gefüllt und die Säule an die entsprechende Position des Synthesizer angebracht. Zur Synthese wurden Standard 3' Phosphoramidite  $[(MeO)_2Tr]ib^2G_d$ ,  $[(MeO)_2Tr]bz^6A_d$ ,  $[(MeO)_2Tr]bz^4C_d$ ,  $[(MeO)_2Tr]T_d$ ) verwendet.

Die Synthese des Oligomers folgt dem regulären Phosphoramidit Protokoll für DNA Synthesizer im Trityl off Modus. Das Oligonucleotid wird mit 25 % NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (8 h bei 55 °C) abgespalten bzw. entschützt. Zur Reinigung wird eine Ionenaustausch Chromatographie an MonoQ (5.0 x 50 mm Säule von Amersham Pharmacia Biotech) angewendet (A: 10mM Natriumhydroxid/Wasser B: 1M Natriumchlorid in 10 mM Natriumhydroxid/Wasser, Fluß rate: 1ml/min in 30 min von 0 % B auf 100% B.) Das markierte Oligomer wird durch Dialyse oder durch Gelfiltration entsalzt und lyophilisiert.

Fig 1 zeigt ein HPLC Chromatogramm. Die HPLC Bedingungen waren wie folgt: Säule: RP18 Bi-schoff Hypersil ODS 5μ NC (250x4.6 mm) Part 25461805, Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat pH 6.8, Puffer B: 1l A + 1l Acetonitril, Gradient: 2min 0 % B, in 23 min auf 100 % B, für 8 min 100% B, Flußrate: 1ml/min. Detektion bei 260 nm.

Fig 2 zeigt ein MALDI MS Spektrum (Voyager DE, PerSeptive Biosystems, Matrix: 3 Hydroxypicolinsäure) Der Peak bei m/z = 8798.2 entspricht der Masse des Oligonukleotids, der Peak bei m/z = 10598.2 ist ein interner Standard.

Beide Abbildungen zeigen, dass ein erfindungsgemäßes 3'-markiertes Oligonukleotid mit hoher Reinheit synthetisiert werden konnte.

#### Kurzbeschreibung der Abbildungen:

Fig. 1:

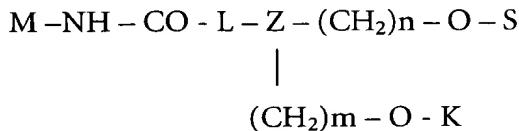
HPLC-Chromatogramm eines erfindungsgemäß synthetisierten Oligonukleotids mit einer Fluoresceinmarkierung am 3' Ende

Fig. 2:

Massenspektrogramm desselben erfindungsgemäß synthetisierten Oligonukleotids.

## Ansprüche

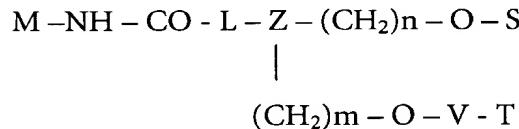
### 1. Markierungsreagens der Struktur



wobei

- M eine detektierbare Markierung ist,
- L einen Linker der Struktur –  $(CH_2)_p$  – oder der Struktur –  $(CH_2)_p - CO - NH -$  darstellt
- Z entweder CH oder N ist,
- S eine abspaltbare Schutzgruppe ist,
- n, m und p voneinander unabhängige natürliche Zahlen von 1-15 sind,
- O - K entweder ein Phosphoramidit ist,  
oder K = – V - T, so dass T ein Festphasen-Trägermaterial ist, und  
V eine Verbindungsgruppe ist, die eine abspaltbare Bindung enthält

### 2. Markierter reaktiver Träger der Struktur



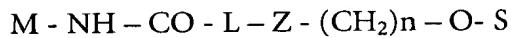
wobei

- M eine detektierbare Markierung darstellt,
- L einen Linker der Struktur –  $(CH_2)_p$  – oder der Struktur –  $(CH_2)_p - CO - NH -$  darstellt
- Z entweder CH oder N ist,
- S eine abspaltbare Schutzgruppe ist,
- n, m und p voneinander unabhängige natürliche Zahlen von 1-15 sind,
- T ein Festphasen-Trägermaterial ist, und

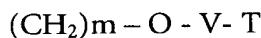
- V eine Verbindungsgruppe ist, die eine abspaltbare Bindung enthält

3. Markierter reaktiver Träger der Struktur

5



|



10

wobei

- M eine detektierbare Markierung darstellt
- S eine abspaltbare Schutzgruppe ist
- n und m voneinander unabhängige natürliche Zahlen von 1-15 sind,
- T ein Festphasen-Trägermaterial ist, und
- V eine Verbindungsgruppe ist, die eine abspaltbare Bindung enthält

15

dadurch gekennzeichnet, daß L einen Linker der Struktur

20



darstellt und p eine natürliche Zahl von 1-15 ist.

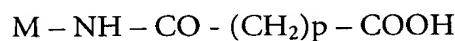
25

4. Träger nach Anspruch 2-3, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial aus Glaspartikel mit einer definierten Porengröße besteht.

30

5. Träger nach Anspruch 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß die detektierbare Markierung M ein Fluoreszenzfarbstoff, vorzugsweise Fluorescein ist.

6. Verwendung eines Moleküls der Struktur



35

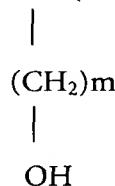
wobei p eine natürliche Zahl zwischen 1 und 15 darstellt und M eine detektierbare Markierung darstellt, zur Herstellung eines Trägers gemäß Anspruch 2-5

5 7. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach Anspruch 2-5, enthaltend folgende Schritte:

- a) Bereitstellung eines trifunktionellen Abstandshalters mit 2 reaktiven Hydroxylgruppen und einer reaktiven Aminogruppe
- b) Einführung der Schutzgruppe an einer Hydroxylgruppe
- 10 c) Umwandlung der Carbonsäuregruppe eines Moleküls gemäß Anspruch 6 in einen aktivierten Ester
- d) Kopplung des aktivierten Esters an die reaktive Aminogruppe des trifunktionellen Abstandshalters
- 15 e) Kopplung der noch freien Hydroxylgruppe des trifunktionellen Abstandshalters an das Trägermaterial

8. Verwendung eines trifunktionellen Abstandshalters der Struktur

20 HOOC - L - Z - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - OH



wobei

- Z entweder CH oder N ist
- L einen Linker der Struktur -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>- oder der Struktur -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CO-NH- darstellt, und
- 30 - m, n und p unabhängig voneinander jeweils eine natürliche Zahl zwischen 1 und 15 sind,

zur Herstellung eines Trägers gemäß Anspruch 2-5.

9. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach Anspruch 2-5, enthaltend folgende Schritte:

- a) Bereitstellung einer trifunktionellen Abstandshalters gemäß Anspruch 8
- b) Einführung der Schutzgruppe an eine Hydroxylgruppe
- 5 c) Umwandlung der Carbonsäuregruppe des trifunktionellen Abstandshalters in einen aktivierten Ester
- d) Kopplung einer freien Aminogruppe enthaltenden detektierbaren Moleküls durch Umsetzung des aktivierten Esters mit der Aminogruppe
- e) Kopplung der noch freien Hydroxylgruppe an das Trägermaterial

10

10. Verwendung eines Trägers gemäß Anspruch 2-5 zur Synthese 3'-markierter Nukleinsäuren

15

11. 3'-markiertes Nukleinsäuremolekül, hergestellt mit Hilfe eines Trägers gemäß Anspruch 2-5.

20 12. Nukleinsäuremolekül, enthaltend an der 3'-Position der 3'-terminalen Ribose einen Substituenten mit der Teilstruktur

- CH<sub>2</sub> - CO - NH - M,

25 wobei M eine detektierbare Markierung, beispielsweise einen Fluoreszenzfarbstoff ist.

30 13. Markierungsreagenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß O-K ein Phosphoramidit ist.

35 14. Markierungsreagenz nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die detektierbare Markierung M ein Fluoreszenzfarbstoff, vorzugsweise Fluorescein ist.

15. Verwendung eines Markierungsreagens gemäß Anspruch 13-14 zur Synthese markierter Nukleinsäuren

5 16. Markiertes Nukleinsäuremolekül, hergestellt mit Hilfe eines Markierungsreagens gemäß Anspruch 13-14

10 17. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 16, enthaltend einen Substituenten mit der Teilstruktur



wobei M eine detektierbare Markierung, beispielsweise ein Fluoreszenzfarbstoff ist.

15

## Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Markierungsreagens, bei dem die Markierung über eine Amidbindung und einen Linker an den Rest des Moleküls gebunden ist, im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß das N-Atom der Amidbindung und die Markierung direkt durch eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind. Dabei kann es sich insbesondere um entsprechende Phosphoramidite oder um reaktive Träger für die Nukleinsäuresynthese handeln. Gegenstand der Erfindung sind darüber hinaus Verfahren zur Herstellung derartiger Träger aus dafür geeigneten Vorstufen.

Fig. 1

1/2

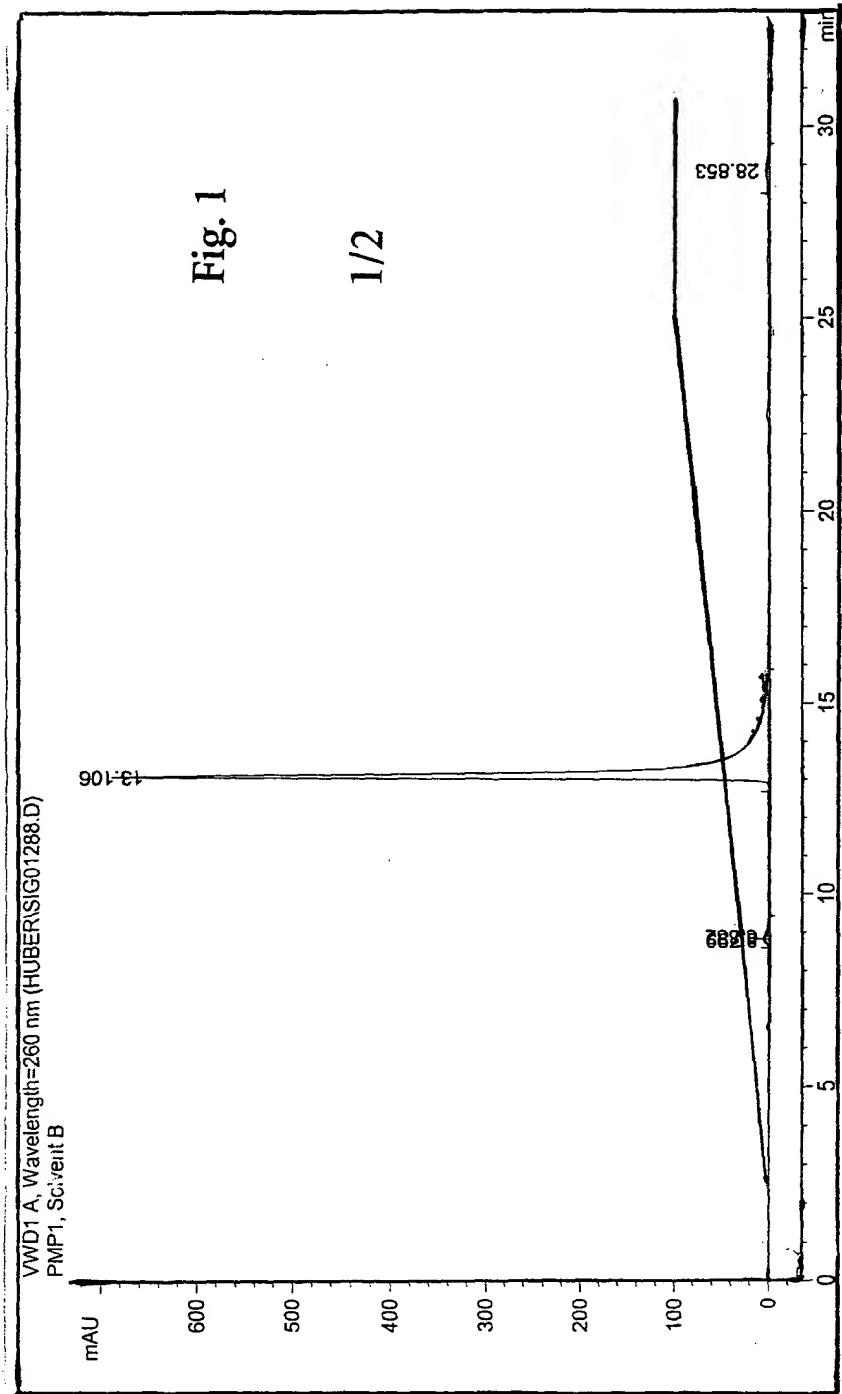
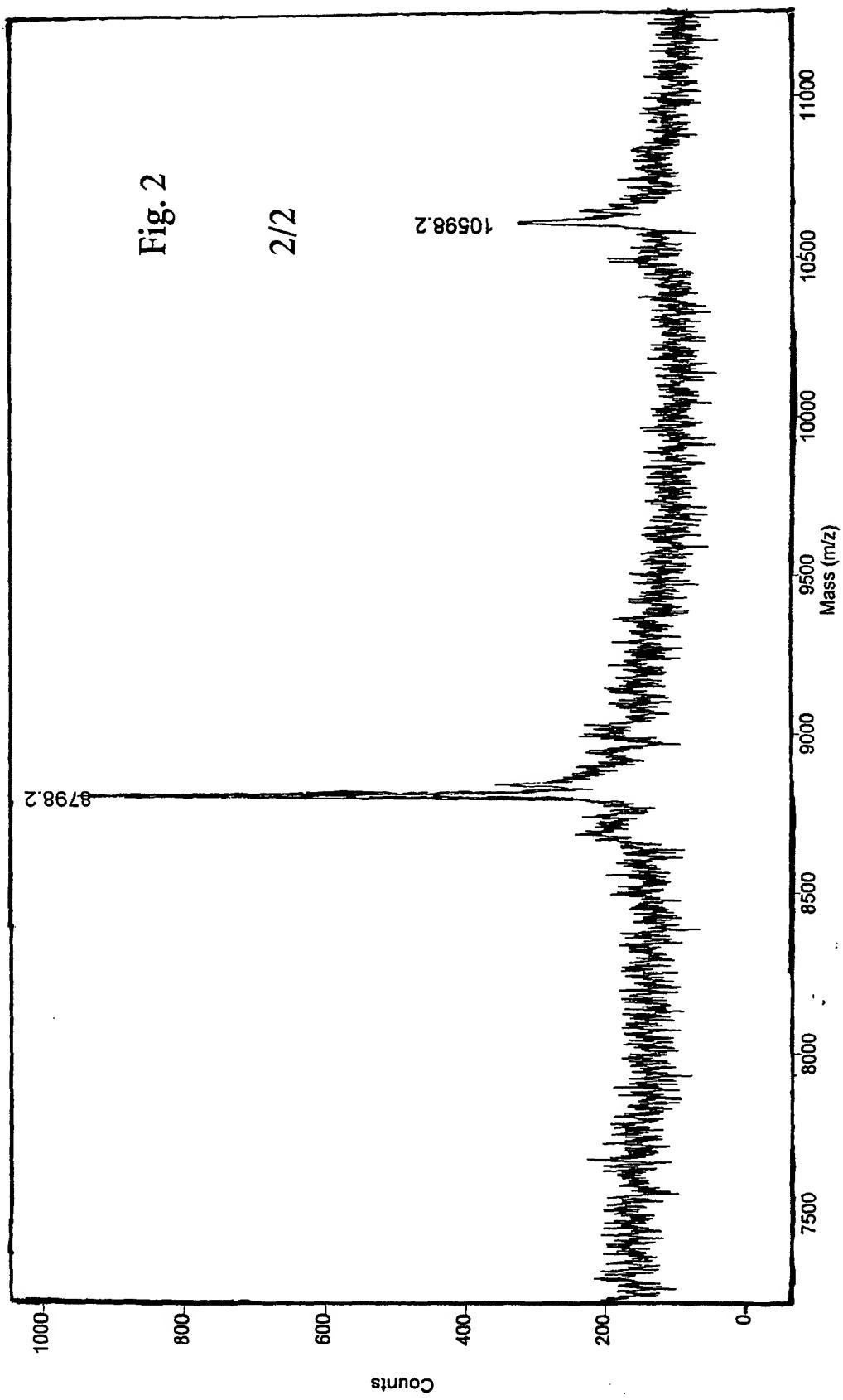


Fig. 2

2/2



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231



**GENERAL APPOINTMENT OF REPRESENTATIVE FOR**  
**U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE MATTERS**

The undersigned applicant or assignee hereby appoints D. Michael Young, Reg. No. 33,819, Brent A. Harris, Reg. No. 39,215, Richard T. Knauer, Reg. No. 35,575, Kenneth J. Waite, Reg. No. 45,189, Marilyn L. Amick, Reg. No. 30,444, and Michelle Neff, Reg. No. 47,817, all of Roche Diagnostics Corporation, 9115 Hague Road, P.O. Box 50457, Indianapolis, Indiana 46250, Telephone No. (317) 845-2000, and Jill Lynn Woodburn, Reg. No. 39,874 of The Law Office of Jill L. Woodburn, L.L.C., 6633 Old Stonehouse Drive, Newburgh, Indiana 47630-1785, Telephone No. (812) 842-2660:

to prosecute and transact all business on its behalf before the United States Patent and Trademark Office in connection with any U.S. patent assigned to it and any U.S. patent application filed by it or on its behalf and to receive payments on its behalf.

Signed this 11th day of April, 2001 at Mannheim, Germany.

Roche Diagnostics GmbH

M. Jung  
Signature

Dr. Michael Jung

Print Name

Senior Director

Position or Title

Roche Diagnostics GmbH

A. Silber  
Signature

Dr. Anton Silber

Print Name

Director

Position or Title